

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090556** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.07.10

(51) Int. Cl. *C11D 3/386* (2006.01)  
*C12N 9/26* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.09.20

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ АЛКОГОЛЬНОГО НАПИТКА, СОДЕРЖАЩАЯ *BACILLUS COAGULANS***

---

(31) 201741033477

(32) 2017.09.21

(33) IN

(86) PCT/US2018/051879

(87) WO 2019/060501 2019.03.28

(71) Заявитель:  
САМИ ЛАБС ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:

Маджид Мухаммед, Нагабхушанам  
Кальянам (US), Арумугам Сивакумар,  
Али Фуркан (IN), Маджид Шахин  
(US), Биде Киранкумар (IN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.  
(RU)

---

(57) Описывается композиция алкогольного напитка с пробиотиком, содержащая *Bacillus coagulans*, в которой указанные споры или вегетативные клетки *Bacillus coagulans* показали высокое восстановление, переносимость, совместимость и жизнеспособность спор и вегетативных клеток после варки. Также описаны способы изготовления композиции алкогольного напитка, содержащей *Bacillus coagulans*, в которой указанные споры или бактерии добавляют во время предварительной ферментации, во время стадий ферментации и постферментации.

---

**A1**

**202090556**

**202090556**

**A1**

## КОМПОЗИЦИЯ АЛКОГОЛЬНОГО НАПИТКА, СОДЕРЖАЩАЯ BACILLUS COAGULANS

### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка является заявкой PCT, в которой испрашивается приоритет по индийской предварительной заявке на патент IN201741033477, поданной 21 сентября 2017 г.

### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение в целом относится к пробиотикам. Более конкретно, изобретение относится к композициям алкогольного напитка, содержащим пробиотическую бактерию *Bacillus coagulans*, и способу изготовления указанного алкогольного напитка.

### ОПИСАНИЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

Пробиотики предлагают широкий спектр преимуществ для здоровья. Их вводят в качестве пищевой добавки для эффективного лечения различных заболеваний, таких как желудочно-кишечные инфекции, воспалительные заболевания кишечника, острая и хроническая диарея, запоры, аномальная кишечная ферментация, дисбактериоз, функциональная абдоминальная боль, непереносимость лактозы, аллергии, инфекции мочеполовой системы, муковисцидоз, нарушение обмена веществ, различные виды рака, уменьшение побочных эффектов антибиотиков, в отношении здоровья полости рта, таких как профилактика кариеса, заболеваний пародонта и неприятного запаха изо рта, поддержание хорошей кишечной среды и уравнивание кишечной флоры за счет сокращения численности вредных бактерий (Goldin BR (1998) Health benefits of probiotics, *The British Journal of Nutrition* 80(4):S203-7; Singh et al., (2013) Role of probiotics in health and disease: a review, *JPM. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(2):253-25).

Потребление алкоголя под предлогом общения, расслабления и удовольствия растет, даже с учетом того, что употребление избыточного количества алкоголя оказывает побочное воздействие на здоровье. Алкоголь влияет на кишечник, нарушая кишечную абсорбцию питательных веществ, в том числе нескольких важных витаминов. Исследования также сообщают, что алкоголь значительно модулирует иммунную систему слизистой оболочки кишечника (Bode et al., (2003) Effect of alcohol consumption on the gut, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 17(4):575-592). Употребление алкоголя также изменяет микрофлору кишечника, тем самым нейтрализуя полезные эффекты, которые микробы кишечника оказывают на общее состояние здоровья (Bob Roehr, 2016,

Drinking Causes Gut Microbe Imbalance Linked to Liver Disease, The Scientific American, <https://www.scientificamerican.com/article/drinking-causes-gut-microbe-imbalance-linked-to-liver-disease/>, по состоянию на 10 сентября 2018 года).

Было предпринято много попыток обратить влияние алкоголя на микрофлору кишечника. Было установлено, что добавки с пробиотиками эффективны в восстановлении флоры кишечника и улучшении живых ферментов при повреждении печени и гепатотоксичности, вызванных алкоголем (Kirpich et al. (2008) Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study; Alcohol; 42(8):675-682). Пиво, содержащее пробиотики, также было разработано для предотвращения вредного воздействия потребления пива на кишечную флору (SG 10201702468S, PROBIOTIC SOUR BEER). Однако разработка алкогольного напитка с использованием живых пробиотиков является сложной задачей, поскольку наличие кислых условий препятствует росту и выживанию пробиотиков. Свойство пробиотика выдерживать вредные условия также играет важную роль в разработке алкогольного напитка, содержащего пробиотики. До сих пор существует неудовлетворенная промышленная потребность в поиске подходящего пробиотического штамма для разработки алкогольного напитка, содержащего пробиотики. Настоящее изобретение решает вышеуказанную проблему, описывая композицию алкогольного напитка, содержащую *Bacillus coagulans*, с повышенным восстановлением, переносимостью, совместимостью и жизнеспособностью спор и вегетативных клеток пробиотических бактерий *Bacillus coagulans*, и способ ее изготовления.

Основной целью изобретения является раскрытие композиции алкогольного напитка, содержащей пробиотические бактерии *Bacillus coagulans*.

Еще одной целью изобретения является описание способа изготовления композиции алкогольного напитка, содержащей пробиотические бактерии *Bacillus coagulans*.

Настоящее изобретение решает вышеуказанную задачу и обеспечивает дополнительные сопутствующие преимущества.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение раскрывает композицию алкогольного напитка, содержащую *Bacillus coagulans* в форме спор или бактерии, где указанная спора или бактерия демонстрируют высокое восстановление, переносимость, совместимость и жизнеспособность спор и вегетативных клеток после изготовления указанного напитка. Изобретение также раскрывает способ изготовления композиции алкогольного напитка,

содержащей *Bacillus coagulans*, где указанную спору или бактерию добавляют до ферментации, во время ферментации и постферментации.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего более подробного описания, взятого вместе с сопровождающими изображениями, которые иллюстрируют, в качестве примера, принцип изобретения.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа соложения при изготовлении напитка.

Фиг. 1b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа соложения при изготовлении напитка.

Фиг. 2a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа добавления хмеля при изготовлении напитка.

Фиг. 2b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа добавления хмеля при изготовлении напитка.

Фиг. 3a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа ферментации при изготовлении напитка.

Фиг. 3b представляет собой графическое изображение, показывающее процент жизнеспособности пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа ферментации при изготовлении напитка.

Фиг. 4a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа вторичной ферментации при изготовлении напитка.

Фиг. 4b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа вторичной ферментации при изготовлении напитка.

Фиг. 5a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Bacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа карбонизации при изготовлении напитка.

Фиг. 5b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа карбонизации при изготовлении напитка.

Фиг. 6a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации при изготовлении напитка.

Фиг. 6b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации при изготовлении напитка.

Фиг. 7a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке при 25 °С, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации с последующей карбонизацией при изготовлении напитка.

Фиг. 7b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке при 25 °С, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации с последующей карбонизацией при изготовлении напитка.

Фиг. 8a представляет собой графическое изображение, показывающее стабильность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке при 40 °С, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации с последующей карбонизацией при изготовлении напитка.

Фиг. 8b представляет собой графическое изображение, показывающее процентную жизнеспособность пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* в алкогольном напитке при 40 °С, добавленных во время этапа упаковки и пастеризации с последующей карбонизацией при изготовлении напитка.

## ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение раскрывает композицию алкогольного напитка, содержащую *Vacillus coagulans* в форме спор или бактерии, где указанные спора или бактерия демонстрируют высокое восстановление, переносимость, совместимость и жизнеспособность спор и вегетативных клеток после изготовления напитка. В связанном варианте осуществления алкогольный напиток ферментируется и дистиллируется. В другом связанном варианте осуществления алкогольный напиток является карбонизированным и некарбонизированным.

В еще одном связанном варианте осуществления ферментированный алкогольный напиток выбран из группы, состоящей из пива, эля, ячменного вина, горького эля, бурого эля, бочкового эля, мягкого эля, старого эля, бледного эля, шотландского эля, портера, стаута, выдержанного эля, фруктового пива, пива, лагеря, светлого лагеря, бока, мэрцена/пива октоберфест, пильзенера, шварцбира, сахти, легкого пива, пшеничного пива, бельгийского белого пива, каюма, чичи, сидра, грушевого сидра, сливового джеркума, дези-дару, желтого вина, горянкового (икариин) ликера, касири, килью, кумыса, медового напитка, нихаманчи, пальмового вина, паракари, пульке, сакуры, саке, сонти, тепаче, тисвина, тонто, вина, крепленого вина, портвейна, мадеры, марсалы, хереса, вермута Винсанта, фруктового вина, столового вина, сангрии, игристого вина, шампанского.

В другом связанном варианте осуществления дистиллированный алкогольный напиток выбран из группы, состоящей из, но не ограничиваясь этим, крепких спиртных напитков, абсента, аквавита, эпплджека, арака, аррака, авамори, байцзю, боровички, бренди, арманьяка, коньяка, фруктового бренди, о де ви, шнапса – обствассера, дамассина, химбергиста, киршвассера, Пуэр Уильямса, виллиамина (Williamine), кашасы, джина, джина дамсон, джина слое, горилки, каоляна, маотая, метаксы, мескаля, ректифицированного спирта, огогоро, узо, палинки, писко, потина, раки, ракии, сливовицы, рома, сетю, сингани, соджу, текилы, цуйки, водки, виски, бурбона, канадского виски, ирландского виски, японского виски, чистого спирта (ManX Spirit), ржаного виски, шотландского виски, теннессийского виски, ликеров.

В другом варианте осуществления содержание алкоголя в композиции напитка составляет от 1 до 43 %.

В одном из вариантов осуществления штамм *Bacillus coagulans* предпочтительно представляет собой *Bacillus coagulans* МТСС (Коллекция микробных типовых культур и генный банк) 5856 и штаммы, полученные из *Bacillus coagulans* АТСС (Американская коллекция типовых культур) 31248 и *Bacillus coagulans* АТСС 7050. В другом родственном аспекте живые споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* присутствуют в алкогольных напитках в концентрации от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ (колониеобразующая единица).

В другом предпочтительном варианте осуществления композицию, содержащую алкогольный напиток и *Bacillus coagulans*, используют для терапевтического лечения заболеваний, выбранных из группы, состоящей из, но не ограничиваясь ими, желудочно-кишечной инфекции, воспалительных заболеваний кишечника, острой и хронической диареи, запора, аномальной кишечной ферментации, дисбактериоза, функциональной абдоминальной боли, непереносимости лактозы, аллергий, инфекций мочеполовой системы, муковисцидоза, метаболических расстройств, различных видов рака,

уменьшения побочных эффектов антибиотиков, области здоровья полости рта, такие как профилактика кариеса, заболевания пародонта и неприятного запаха изо рта, поддержания хорошей кишечной среды и балансирования кишечной флоры за счет уменьшения численности вредных бактерий.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение описывает способ изготовления алкогольного напитка с *Bacillus coagulans*, причем указанный способ включает этапы:

- a) соложения,
- b) затирания,
- c) фильтрации,
- d) кипячения в чане,
- e) добавления хмеля,
- f) охлаждения,
- g) дрожжевой ферментации,
- h) выдерживания и осветления,
- i) вторичной ферментации,
- j) карбонизации/отсутствия карбонизации,
- k) пастеризации и упаковки.

В родственном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадий предварительной ферментации, ферментации и постферментации. В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют на стадии предварительной ферментации на этапе a). В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют на стадии предварительной ферментации на этапе e). В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии ферментации на этапе g). В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии вторичной ферментации на этапе i). В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии постферментации на этапе j). В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии постферментации на этапе k).

В еще одном связанном аспекте алкогольный напиток пастеризуют при 60 °C после этапа i) с последующим этапом карбонизации/отсутствия карбонизации после добавления спор *Bacillus coagulans*.

В другом связанном аспекте споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* проявляют повышенную жизнеспособность и стабильность в течение всего процесса ферментации.

Конкретные примеры, включенные в данный документ ниже, иллюстрируют вышеупомянутые наиболее предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения.

Пример 1. Композиция алкогольного напитка, содержащая пробиотические бактерии *Bacillus coagulans*

Способы: образцы пива приобретают в местном магазине, изготовленные Kingfisher, и виски от McDowell's No.1. Содержание алкоголя в мягком лагере, лагере и крепком пиве составило 3,345 %, 3,48 % и 4,81 % соответственно. В виски содержание алкоголя составило 42,8 %. *Bacillus coagulans* MTCC 5856 (коммерчески продаваемый как LactoSpore® от Sabinsa Corporation, Нью-Джерси, США) добавляют в пиво (мягкий лагер, лагер и крепкое пиво) и виски. Образцы пива карбонизируют и упаковывают в контейнер объемом 120 мл и подвергают исследованиям стабильности в соответствии с рекомендациями Международного совета по гармонизации (рекомендации ICH Q1A (R2) (ICH 2003). Описание образцов делают на основе визуальных и органолептических способов. Относительную плотность и pH определяют в соответствии с главой USP Фармакопеи США USP <841> и <791> соответственно. Количество других аэробных микроорганизмов определяют согласно модифицированному методу USP <61>. Количество дрожжей и плесени, *Escherichia coli* (Кишечная палочка), *Staphylococcus aureus* (Золотистый стафилококк), *Pseudomonas aeruginosa* (Синегнойная палочка) и виды *Salmonella* (Сальмонелла) тестируют в соответствии с главой <61> и <62> метода USP. Энтеробактерии тестируют на в соответствии с главой USP <2021> и Coliforms согласно ВAM, глава 4.

В Таблице 1 и Таблице 2 раскрыты восстановление и переносимость спор *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в алкогольных напитках, определенных стандартным методом разливания по чашкам.

Таблица 1. Восстановление и переносимость спор *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в алкогольных напитках, определяемых стандартным методом разливания по чашкам.

Время	Пиво (крепкий лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856	Пиво (мягкий лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856	Пиво (лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856	Виски с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856

	Log <sub>10</sub> КОЕ /порци я	Жизнес пособн ость (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порция	Жизнес пособн ость (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порция	Жизнес пособн ость (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порци я	Жизнес пособно сть (%)
Ожидае мое восстано вление	9,544	100	9,544	100	9,544	100	9,544	100
Отсутствие карбонизации								
После 24 ч	8,992	94,22	8,968	93,97	8,851	92,75	9,041	94,73
Карбонизация								
После 24 ч	8,877	93,01	8,895	93,21	8,884	93,09	ND	ND

Размер порции для пива составляет 650 мл, а для виски 100 мл. ND означает «не проведено».

Таблица 2. Восстановление и переносимость спор *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в алкогольных напитках, определенных методом проточной цитометрии

Время	Пиво (крепкий лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856		Пиво (мягкий лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856		Пиво (лагер) с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856		Виски с <i>B. coagulans</i> MTCC 5856	
	Log <sub>10</sub> КОЕ /порци я	Жизнес пособн ость (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порци я	Жизнеспо собность (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порция	Жизнес пособн ость (%)	Log <sub>10</sub> КОЕ /порция	Жизнес пособно сть (%)
Ожидаем ое восстано вление	9,544	100	9,544	100	9,544	100	9,544	100
Отсутствие карбонизации								
После 24	9,389	98,37	8,845	92,67	8,792	92,12	8,698	91,13

ч								
	Карбонизация							
После 24 ч	8,845	92,67	8,812	92,33	9,133	95,69	ND	ND

Размер порции для пива составляет 650 мл, а для виски 100 мл. ND означает «не проведено».

Исследования стабильности при комнатной температуре ( $25 \pm 2$  °C, относительной влажности  $60 \% \pm 5 \%$ ) и усиленных условиях ( $40 \pm 2$  °C, относительной влажности  $65\% \pm 5\%$ ) также проводят для определения стабильности пробиотического состава в разных алкогольных напитках. В таблицах 3 - 10 описаны исследования стабильности алкогольного напитка, содержащего пробиотические бактерии *Bacillus coagulans* MTCC 5856.

Таблица 3. Исследования стабильности пива пробиотического мягкого лагера (пиво) при  $40 \pm 2$  °C, относительной влажности  $65 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)					
		Начало	1	2	3	6	Конец
1.	Описание	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Бледно-коричневая жидкость
2.	Относительная плотность	1,0082	1,0083	1,0084	1,0081	1,0085	Запись
3.	pH	3,86	3,84	3,81	3,82	3,79	Запись
4.	Содержание алкоголя, измерено GC (газовая хроматография)	3,34 %	3,31 %	3,39 %	3,37 %	3,38 %	Запись

5.	Численность других аэробных микроорганизмов	Менее 100 КОЕ/мл	Запись				
6.	Численность дрожжей и грибов	Соответствует требованиям	NMT (не более чем) 100 КОЕ/г				
7.	Энтеробактерии	Соответствует требованиям	NMT 100 КОЕ/г				
8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	NMT 10 КОЕ/г				
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г				

Таблица 4. Исследования стабильности пробиотического лагера (пиво) при  $40 \pm 2$  °C, относительной влажности  $65 \% \pm 5 \%$ .



8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	NMT 10 КОЕ/г				
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г				

Таблица 5. Исследования стабильности крепкого пробиотического лагера (пиво) при  $40 \pm 2$  °C, относительной влажности  $65 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)					
		Начало	1	2	3	6	Конец
1.	Описание	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Бледно-коричневая жидкость
2.	Относительная плотность	1,0071	1,0069	1,0072	1,0073	1,0074	Запись
3.	pH	3,91	3,89	3,88	3,86	3,85	Запись
4.	Содержание алкоголя, измерено GC	4,81 %	4,85 %	4,89 %	4,82 %	4,79 %	Запись

5.	Численность других аэробных микроорганизмов	Менее 100 КОЕ/мл	Запись				
6.	Численность дрожжей и грибов	Соответствует требованиям	NMT10 <sup>0</sup> КОЕ/г				
7.	Энтеробактерии	Соответствует требованиям	NMT10 <sup>0</sup> КОЕ/г				
8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	NMT10 <sup>0</sup> КОЕ/г				
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г				

Таблица 6. Исследования стабильности пробиотического виски при  $40 \pm 2$  °C, относительной влажности  $65 \% \pm 5 \%$ .



8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	NMT10 КОЕ/г				
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г				

Таблица 7. Исследования стабильности пробиотического мягкого лагера (пиво) при  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , относительной влажности  $60 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)			
		Начало	3	6	Конец
1.	Описание	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Бледно-коричневая жидкость
2.	Относительная плотность	1,0081	1,0083	1,0086	Запись
3.	pH	3,86	3,85	3,74	Запись
4.	Содержание алкоголя, измерено GC	3,34 %	3,37 %	3,38 %	Запись
5.	Численность других аэробных микроорганизмов	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Запись
6.	Численность дрожжей	Соответствует	Соответствует	Соответствует	NMT100 КОЕ/г

	и грибков	ствует требова ниям	ствует требова ниям	ствует требова ниям	
7.	Энтеробактерии	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	NMT100 КОЕ/г
8	Колиморфные бактерии	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	NMT10 КОЕ/г
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Отсутствуют в 10 г

Таблица 8. Исследования стабильности пробиотического лагера (пиво) при  $25 \pm 2$  °С, относительной влажности  $60 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)			
		Начало	1	6	Конец
1.	Описание	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Соответ ствует требова ниям	Бледно-коричневая жидкость
2.	Относительная плотность	1,0073	1,0071	1,0074	Запись
3.	pH	3,93	3,95	3,82	Запись
4.	Содержание алкоголя, измерено GC	3,48 %	3,45 %	3,47 %	Запись
5.	Численность других аэробных микроорганизмов	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Запись

6.	Численность дрожжей и грибков	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
7.	Энтеробактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT10 КОЕ/г
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г

Таблица 9. Исследования стабильности пива пробиотического крепкого лагера (пиво) при  $25 \pm 2$  °C, относительной влажности  $60 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)			
		Начало	3	6	Конец
	Описание	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Бледно-коричневая жидкость
	Относительная плотность	1,0075	1,0064	1,0077	Запись
	pH	3,91	3,85	3,81	Запись
	Содержание алкоголя, измерено GC	4,81 %	4,87 %	4,75 %	Запись
	Численность других аэробных микроорганизмов	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Менее 100 КОЕ/мл	Запись

	Численность дрожжей и грибков	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
	Энтеробактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
	Колиформные бактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT10 КОЕ/г
	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella)	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г

Таблица 10. Исследования стабильности пробиотического виски (партия: FT/WHL/02) при  $25 \pm 2$  °C, относительной влажности  $60 \% \pm 5 \%$ .

№	Проведенные тесты	Период тестирования (месяцы)			
		Начало	3	6	Конец
1.	Описание	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Бледно-коричневая жидкость
2.	Относительная плотность	0,9453	0,9455	0,9457	Запись
3.	pH	6,21	5,57	5,48	Запись
4.	Содержание алкоголя, измерено GC	42,8 %	42,27 %	42,84 %	Запись
5.	Численность других аэробных	Менее 100	Менее 100	Менее 100	Запись

	микроорганизмов	КОЕ/мл	КОЕ/мл	КОЕ/мл	
6.	Численность дрожжей и грибков	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
7.	Энтеробактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT100 КОЕ/г
8.	Колиморфные бактерии	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	NMT10 КОЕ/г
9.	Патогены (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, виды Salmonella )	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Соответствует требованиям	Отсутствуют в 10 г

Результаты исследований стабильности алкогольных напитков (пива и виски) показали, что включение пробиотического штамма *V. coagulans* MTCC 5856 не влияло на относительную плотность, pH и содержание алкоголя, что предполагает его совместимость и стабильность при хранении при комнатной температуре ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \% \pm 5$  % относительной влажности) и в ускоренных условиях испытания ( $40 \pm 2$  °C,  $65\% \pm 5\%$  относительной влажности).

Кроме того, не наблюдают значительного изменения микробного параметра, что свидетельствует о том, что пробиотический алкогольный напиток не изменяет микробный профиль.

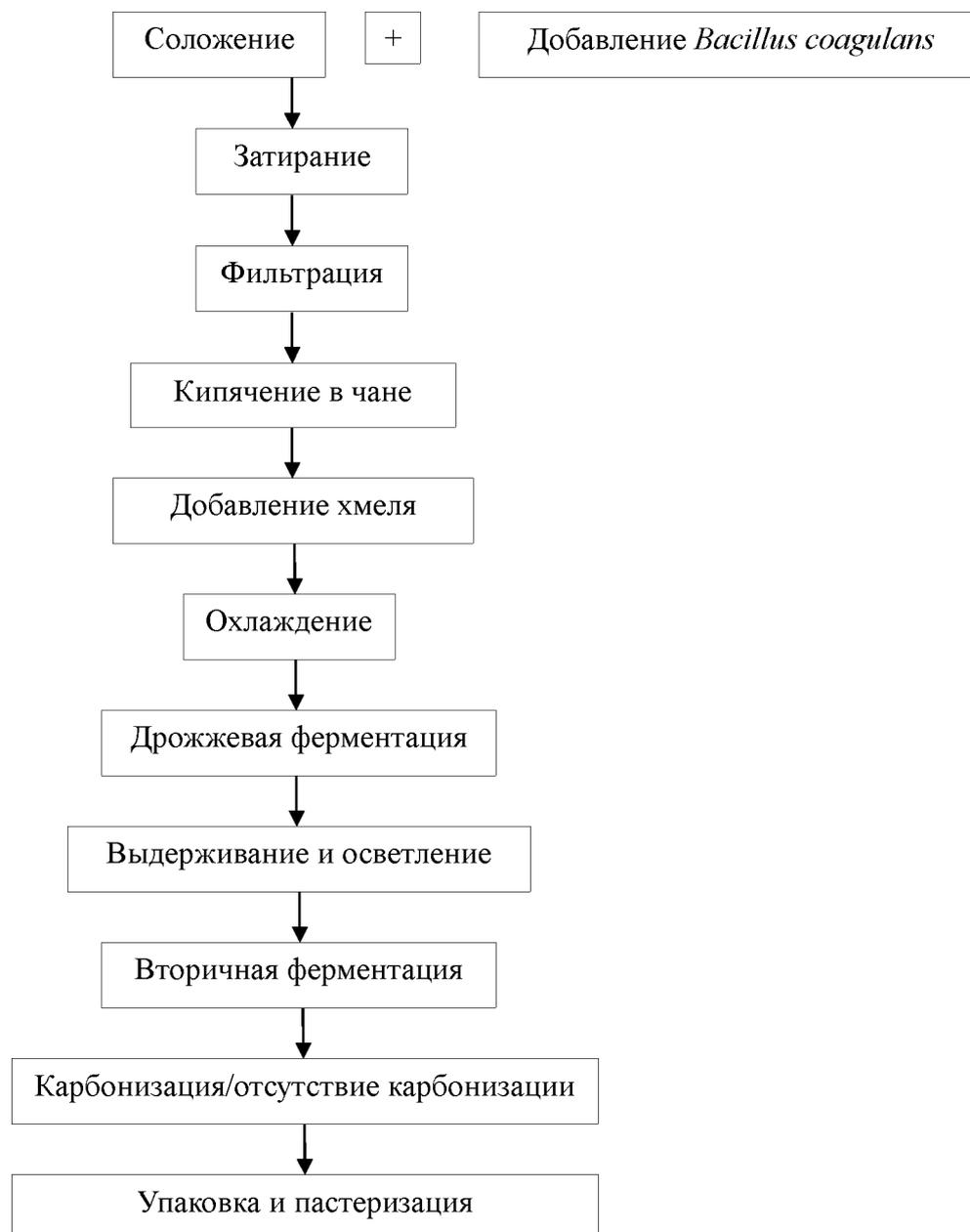
#### Пример 2. Способы изготовления алкогольного напитка с пробиотиком

Различные способы изготовления алкогольного напитка путем добавления пробиотических бактерий *Vacillus coagulans* описаны в настоящем документе.

Способ 1: Добавление *Vacillus coagulans* на стадии предварительной ферментации

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* на этапе соложения

Блок-схема 1:

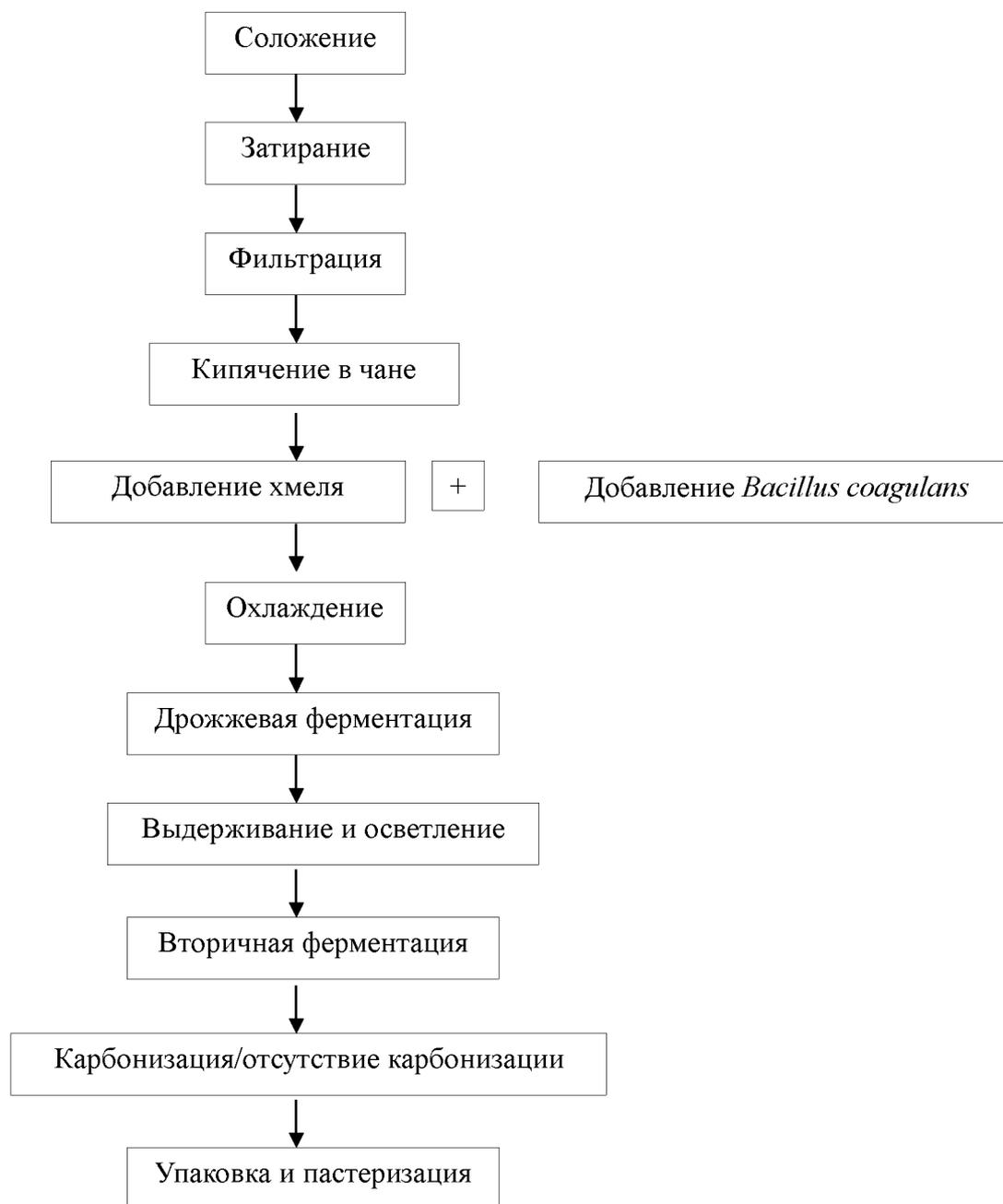


Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 1a) и жизнеспособность (Фиг. 1b) при добавлении на этапе соложения.

Способ 2. Добавление *Bacillus coagulans* на стадии предварительной ферментации на этапе добавления хмеля.

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* на этапе добавления хмеля.

Блок-схема 2:

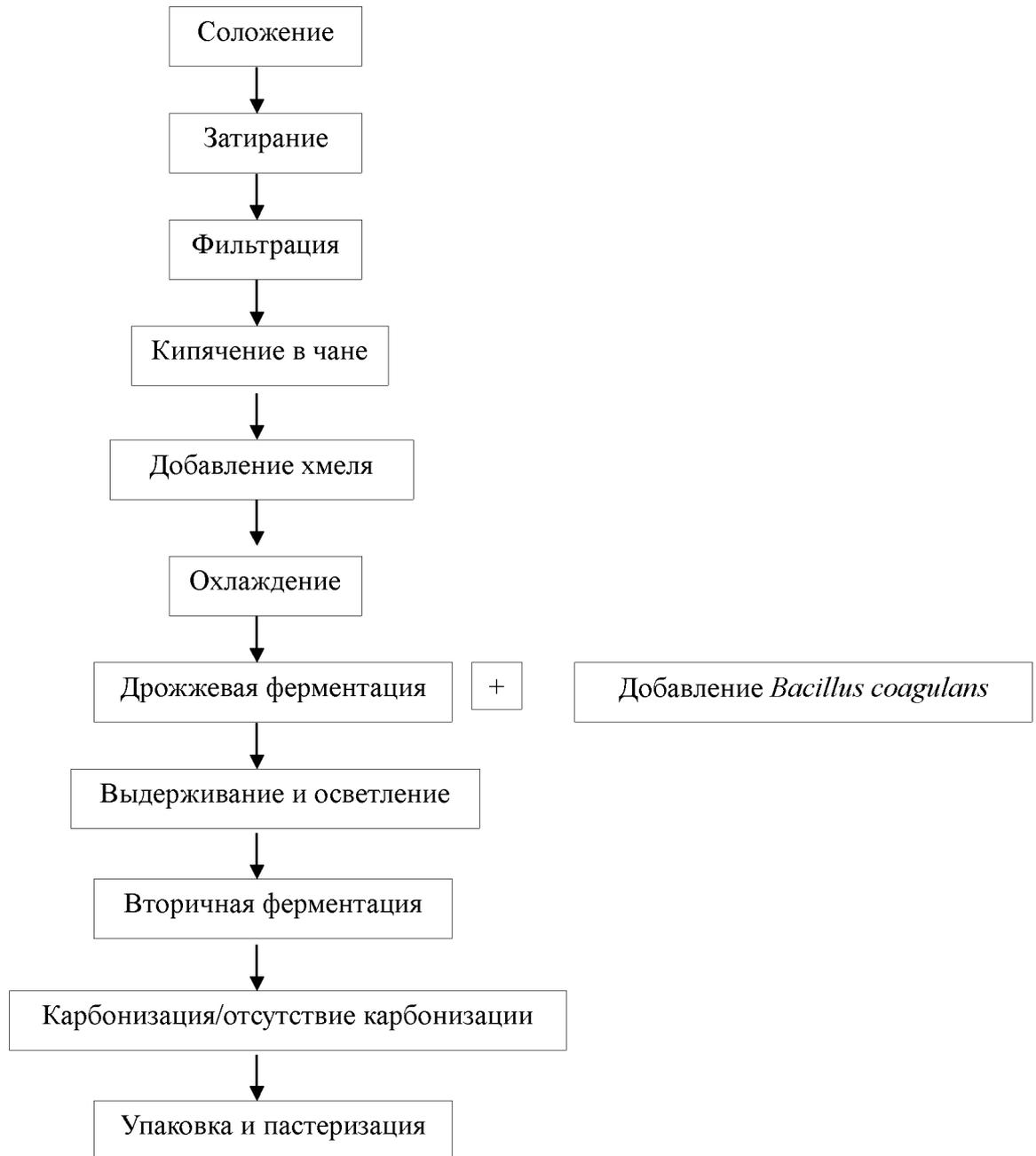


Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 2а) и жизнеспособность (Фиг. 2b) при добавлении на этапе добавления хмеля.

Способ 3: добавление *Bacillus coagulans* во время ферментации

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* во время этапа ферментации.

Блок-схема 3:

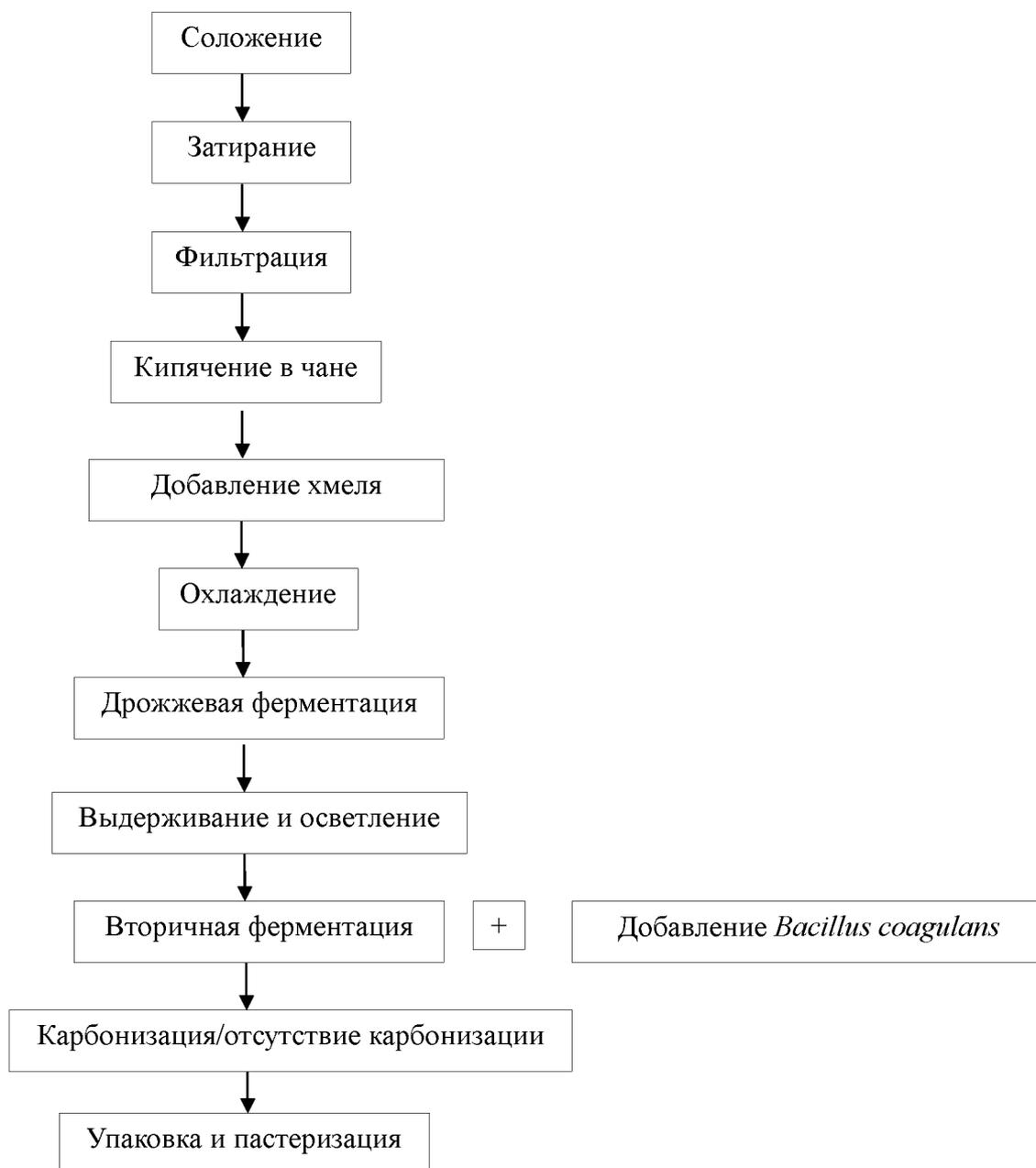


Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 3а) и жизнеспособность (Фиг. 3б) при добавлении во время этапа ферментации.

Способ 4: добавление *Bacillus coagulans* во время вторичной ферментации

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* во время этапе вторичной ферментации.

Блок-схема 4:



Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 4а) и жизнеспособность (Фиг. 4b) при добавлении во время этапа вторичной ферментации.

Способ 5: Добавление *Bacillus coagulans* во время стадии постферментации на этапе карбонизации

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* на этапе карбонизации.

Блок-схема 5:

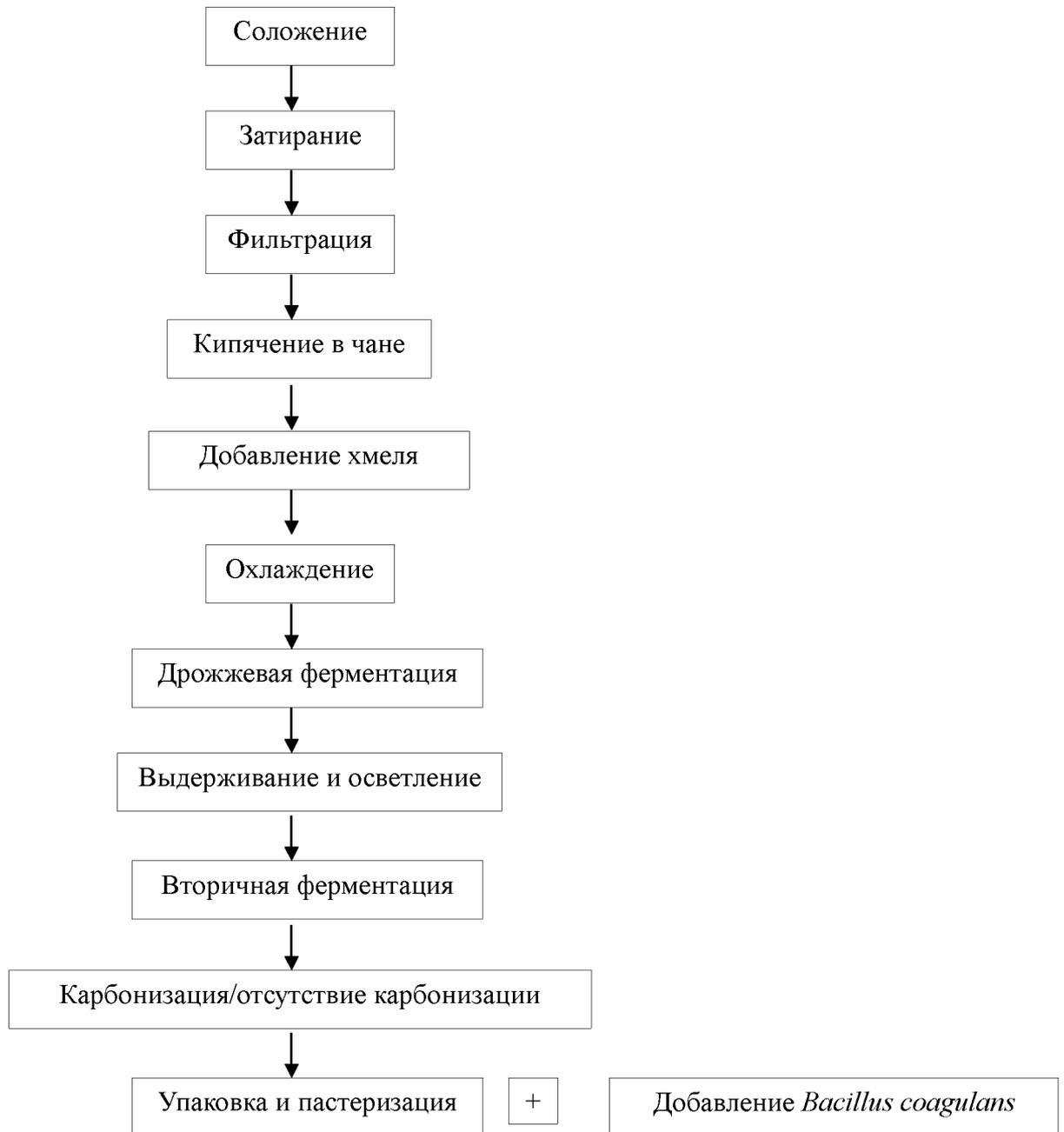


Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 5a) и жизнеспособность (Фиг. 5b) при добавлении во время стадии постферментации на этапе карбонизации.

Способ 6: добавление *Bacillus coagulans* на стадии постферментации на этапе упаковки и пастеризации

Следующая блок-схема описывает способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* на этапе упаковки и пастеризации.

Блок-схема 6:

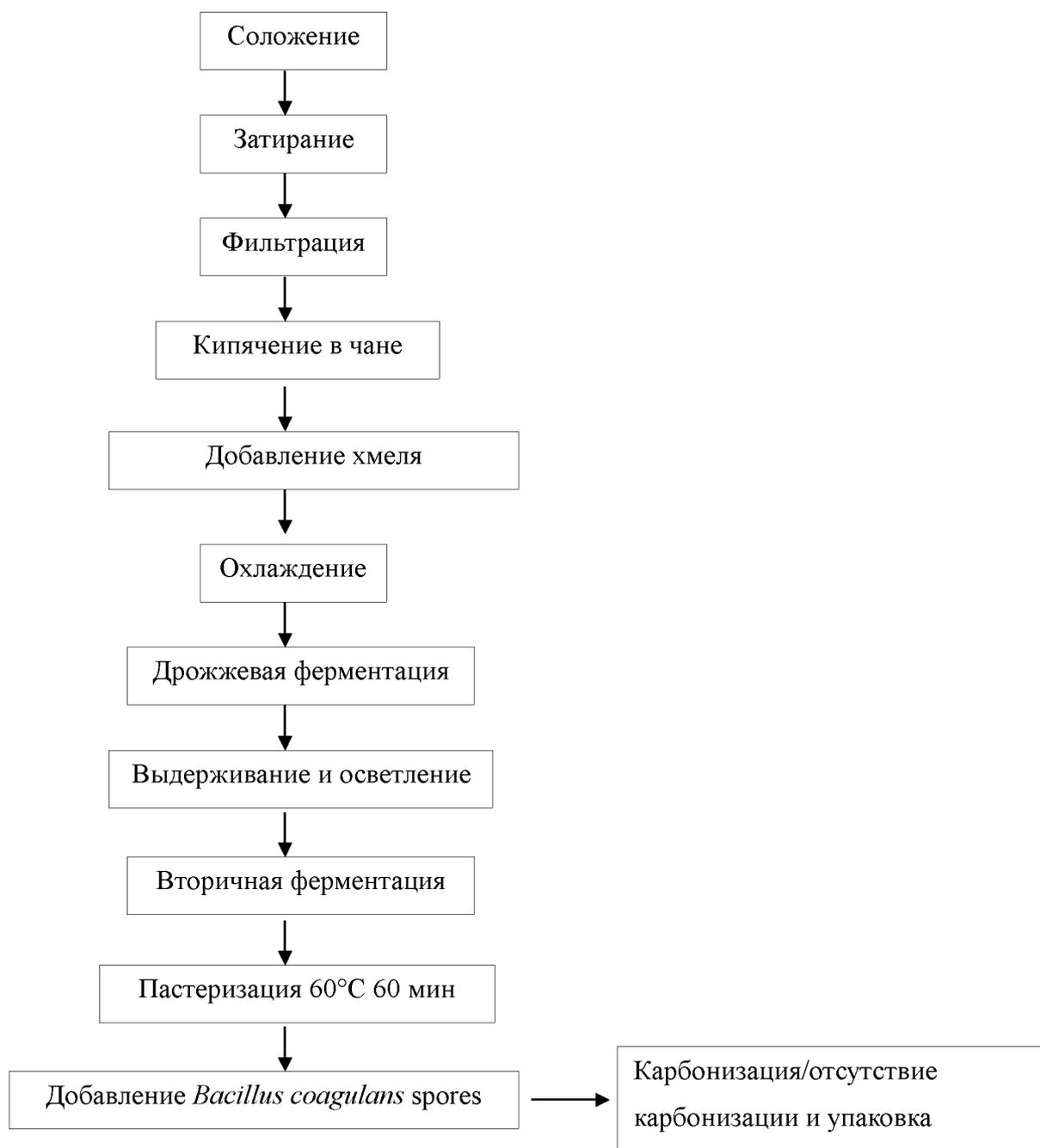


Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность (Фиг. 6a) и жизнеспособность (Фиг. 6b) при добавлении во время стадии постферментации на стадии упаковки и пастеризации.

Способ 7: Добавление *Bacillus coagulans* во время стадии постферментации

На следующей технологической схеме описан способ изготовления алкогольного напитка путем добавления *Bacillus coagulans* на этапе упаковки и пастеризации.

Блок-схема: 7



Тестируют стабильность и жизнеспособность спор/вегетативных клеток *Bacillus coagulans*. Результаты показали, что *Bacillus coagulans* проявили повышенную стабильность при 25 °С (Фиг. 7а) и 40 °С (Фиг. 8а) и жизнеспособность при 25 °С (Фиг. 7б) и 40 °С (Фиг. 8б) при добавлении во время стадии постферментации.

Приведенные выше результаты показывают, что *Bacillus coagulans* является стабильным и жизнеспособным в течение всего процесса ферментации и является первым пробиотиком, добавляемым вместе с алкогольными напитками.

Депонирование биологического материала *Bacillus coagulans* SBC37-01 с инвентарным номером МТСС 5856, упомянутый в настоящей заявке, было сделано 19 сентября 2013 года в Коллекции микробных типовых культур и геном банке (МТСС), CSIR (СНПИ - Совет по научным и промышленным исследованиям) - Институт микробной технологии, Сектор 39-А, Чандигарх - 160036, Индия.

Хотя изобретение было описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления, специалистам в данной области должно быть понятно, что изобретение не ограничивается этим. Скорее, объем изобретения следует толковать только в сочетании с прилагаемой формулой изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ изготовления алкогольного напитка с *Bacillus coagulans*, включающий этапы

- a) соложения,
- b) затирания,
- c) фильтрации,
- d) кипячения в чане,
- e) добавления хмеля,
- f) охлаждения,
- g) дрожжевой ферментации,
- h) выдерживания и осветления,
- i) вторичной ферментации,
- j) карбонизации/отсутствия карбонизации,
- k) пастеризации и упаковки.

2. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадий предварительной ферментации, ферментации и постферментации.

3. Способ по п. 1, где споры /вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии предварительной ферментации на этапе a).

4. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют на стадии предварительной ферментации на этапе e).

5. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии ферментации на этапе g).

6. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии вторичной ферментации на этапе i).

7. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии постферментации на этапе j).

8. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* добавляют во время стадии постферментации на этапе k).

9. Способ по п. 1, где алкогольный напиток пастеризуют при 60 °С после этапа i) с последующим этапом карбонизации/отсутствия карбонизации после добавления спор *Bacillus coagulans*.

10. Способ по п. 1, где споры/вегетативные клетки *Bacillus coagulans* проявляют повышенную жизнеспособность и стабильность в течение всего процесса ферментации.

11. Композиция алкогольного напитка, полученная способом по п. 1, содержащая *Bacillus coagulans* в форме спор или бактерии, где указанные спора или бактерия демонстрируют высокое восстановление, переносимость, совместимость и жизнеспособность спор и вегетативных клеток после изготовления.

12. Композиция по п. 11, где алкогольный напиток является ферментированным или дистиллированным, карбонизированным и некарбонизированным.

13. Композиция по п. 11, где ферментированный алкогольный напиток выбран из группы, состоящей из пива, эля, ячменного вина, горького эля, бурого эля, бочкового эля, мягкого эля, старого эля, бледного эля, шотландского эля, портера, стаута, выдержанного эля, фруктового пива, пива, лагера, светлого лагера, бока, мэрцена/пива октоберфест, пильзенера, шварцбира, саhti, легкого пива, пшеничного пива, бельгийского белого пива, каюма, чичи, сидра, грушевого сидра, сливового джеркума, дези-дару, желтого вина, горянкового (икариин) ликера, касири, килью, кумыса, медового напитка, нихаманчи, пальмового вина, паракари, пульке, сакуры, саке, сонти, тепаче, тисвина, тонто, вина, крепленого вина, портвейна, мадеры, марсалы, хереса, вермута Винсанто, фруктового вина, столового вина, сангрии, игристого вина, шампанского.

14. Композиция по п. 11, где дистиллированный алкогольный напиток выбран из группы, состоящей из крепких спиртных напитков, абсента, аквавита, эпплджека, арака, аррака, авамори, байцзю, боровички, бренди, арманьяка, коньяка, фруктового бренди, о де ви, шнапса – обствассера, дамассина, химбергиста, киршвассера, Пуэр Уильямса, виллиамина (Williamine), кашасы, джина, джина дамсон, джина слое, горилки, каоляна, маотая, метаксы, мескаля, ректифицированного спирта, огоро, узо, палинки, писко, потина, раки, ракии, сливовицы, рома, сетю, сингани, соджу, текилы, цуйки, водки, виски, бурбона, канадского виски, ирландского виски, японского виски, чистого спирта (ManX Spirit), ржаного виски, шотландского виски, теннессийского виски, ликеров.

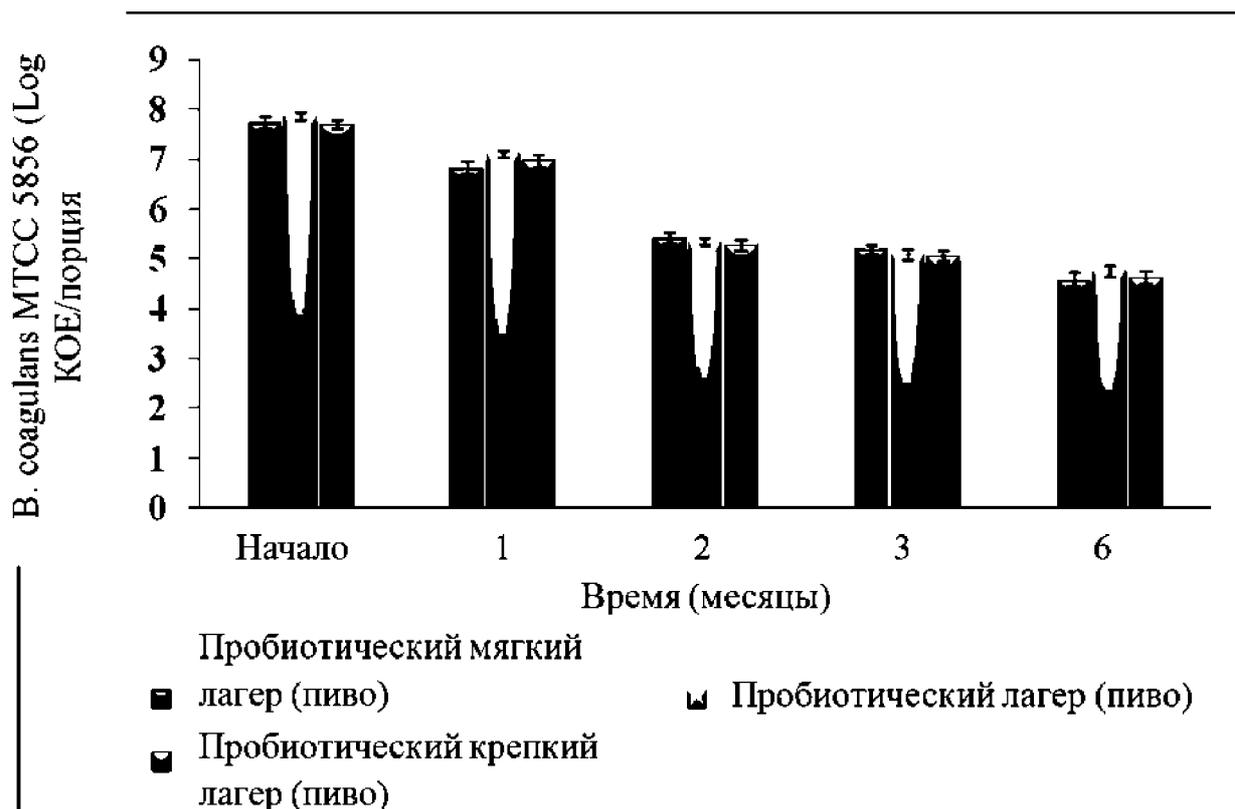
15. Композиция по п. 11, где содержание алкоголя составляет от 1 до 43 %.

16. Композиция по п. 11, где штамм *Bacillus coagulans* предпочтительно представляет собой *Bacillus coagulans* MTCC 5856 и штаммы, полученные из *Bacillus coagulans* ATCC 31248 и *Bacillus coagulans* ATCC 7050.

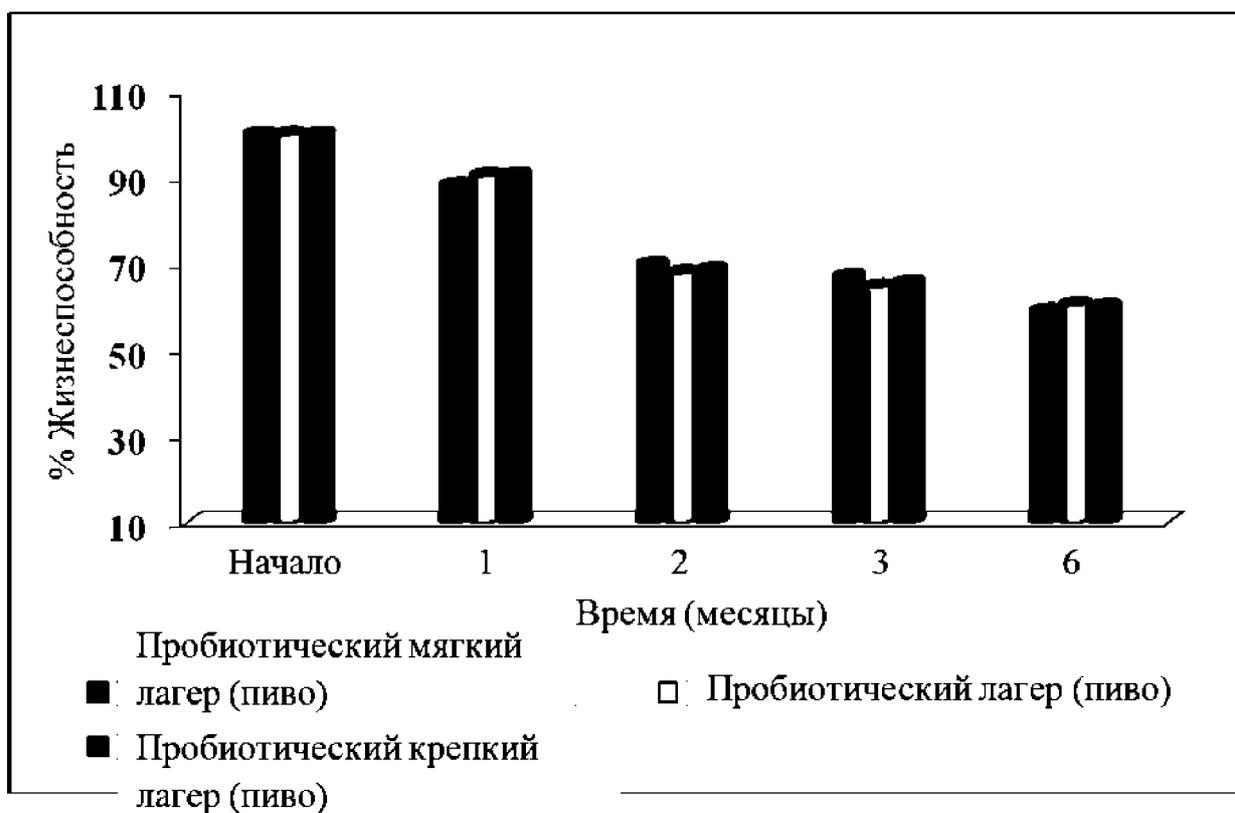
17. Композиция по п. 11, где живые споры *Bacillus coagulans* присутствуют в алкогольных напитках в концентрации от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ (колониеобразующая единица).

18. Композиция по п. 11, где указанная композиция пригодна для терапевтического лечения желудочно-кишечных инфекций, воспалительных заболеваний кишечника, острой и хронической диареи, запоров, аномальной кишечной ферментации, дисбактериоза,

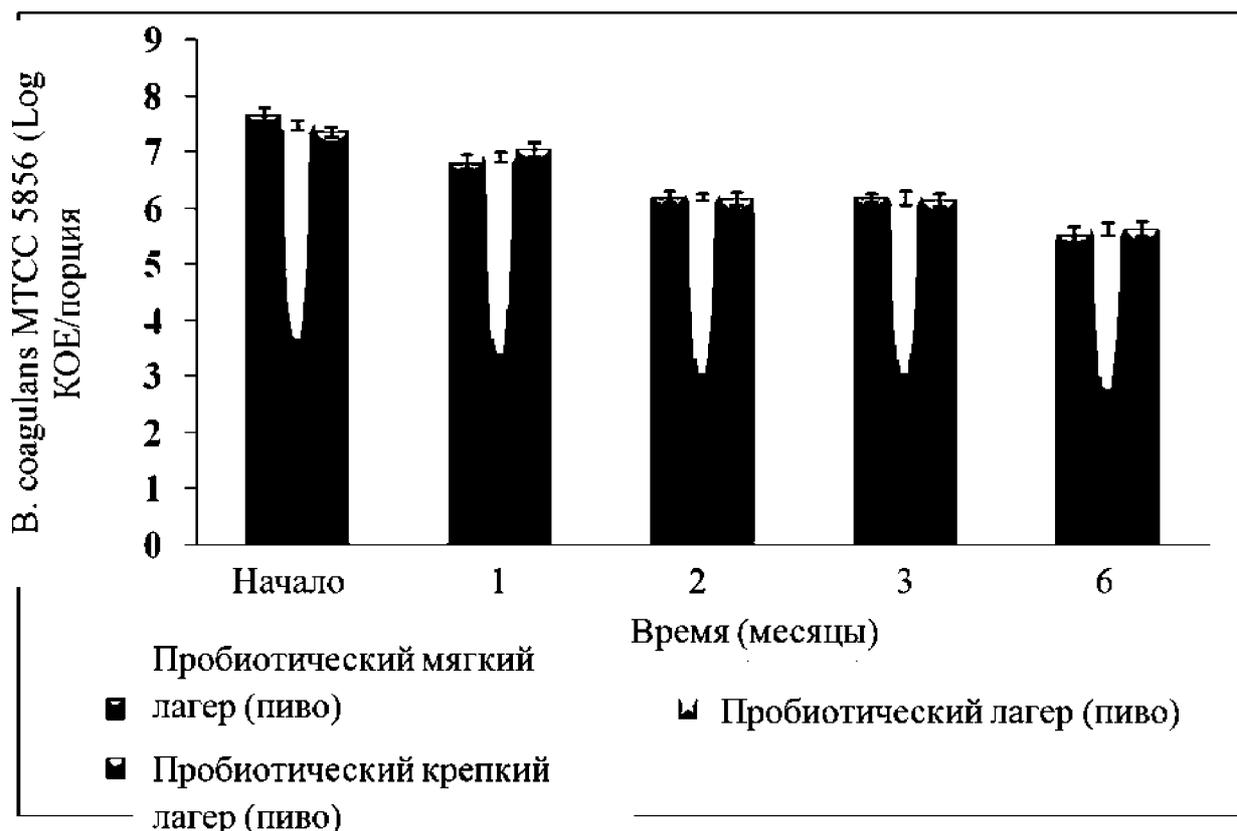
функциональных абдоминальных болей, непереносимости лактозы, аллергий, инфекций мочеполовой системы, муковисцидоза, нарушений обмена веществ, различных видов рака, уменьшения побочных эффектов антибиотиков, профилактики кариеса, заболеваний пародонта и неприятного запаха изо рта, поддержания хорошей кишечной среды за счет уменьшения численности вредных бактерий.



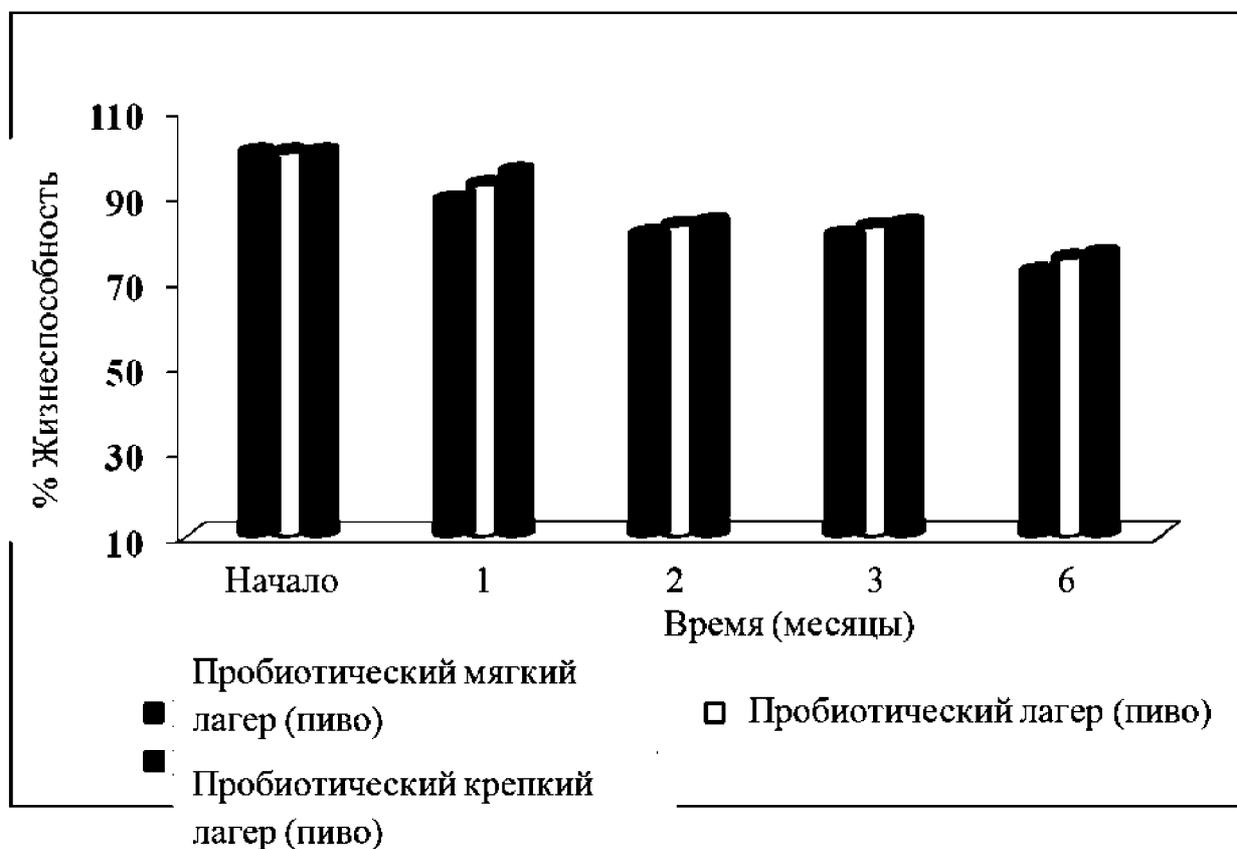
Фиг. 1а



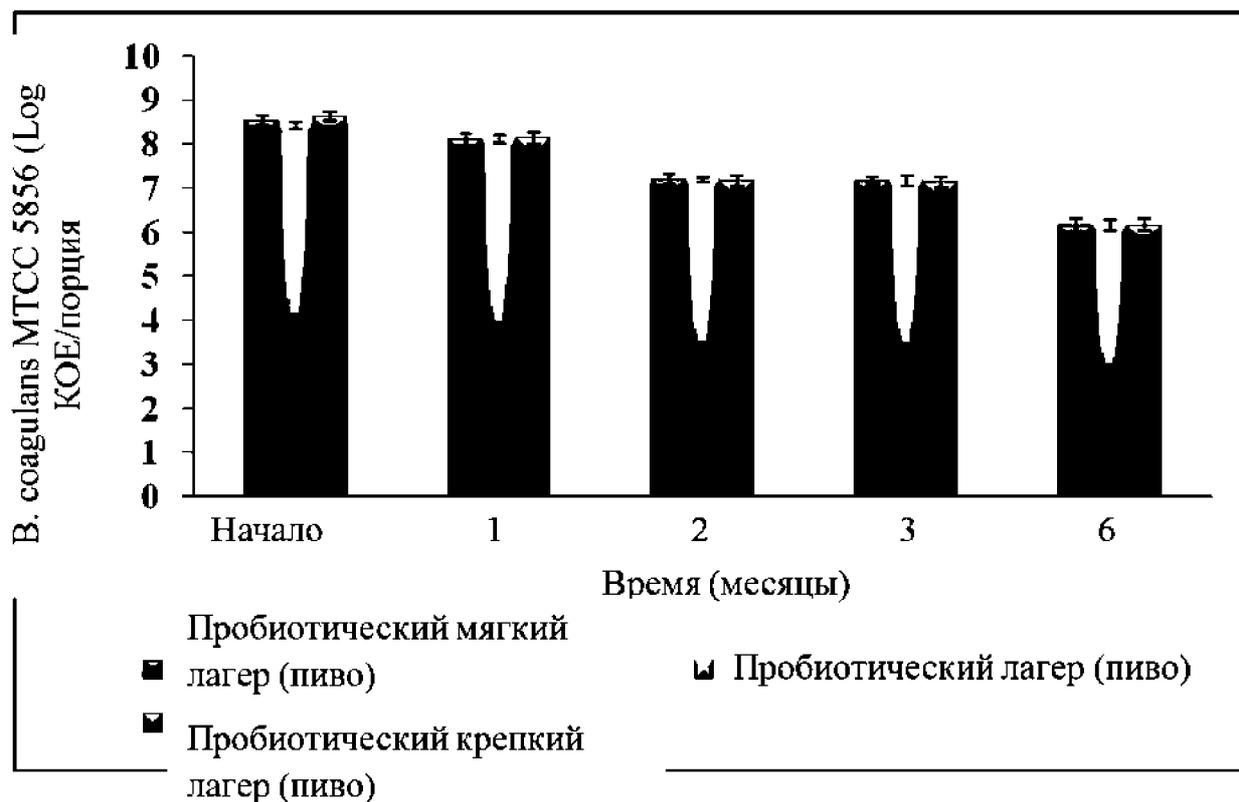
Фиг. 1б



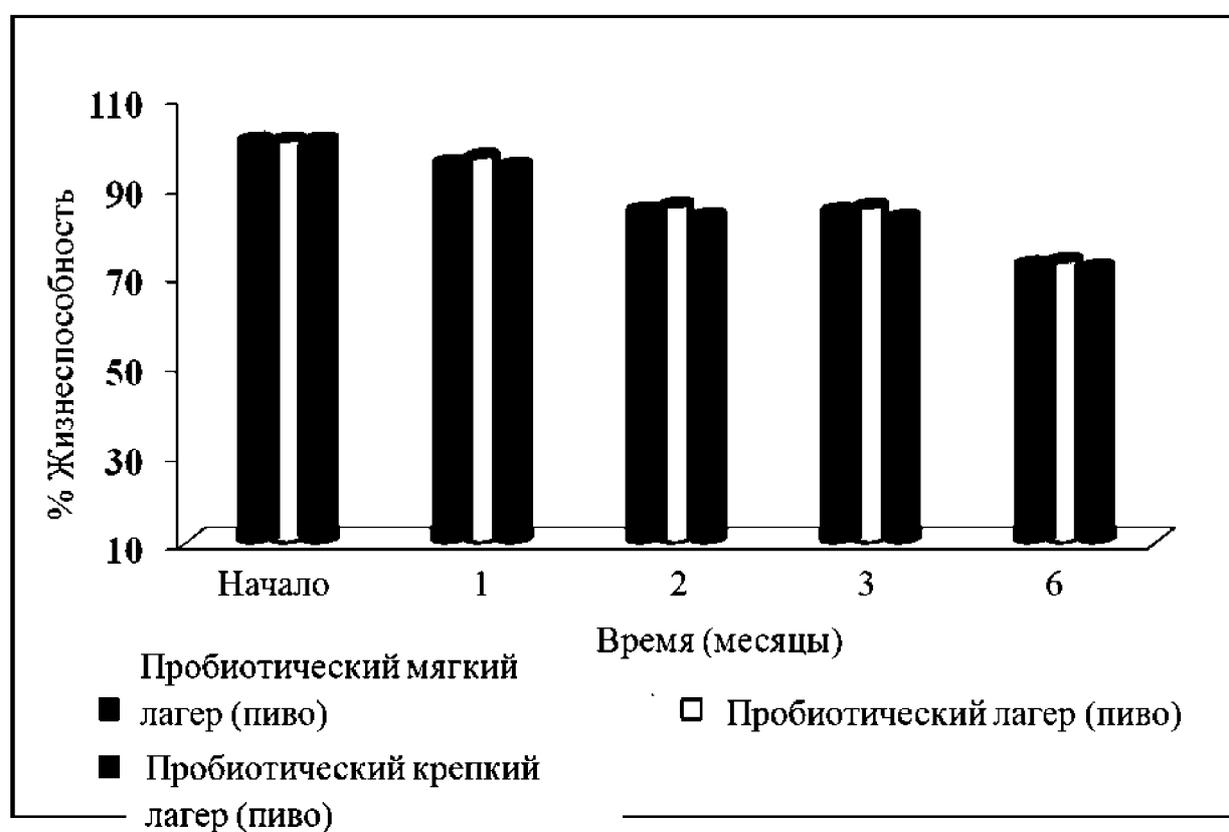
Фиг. 2a



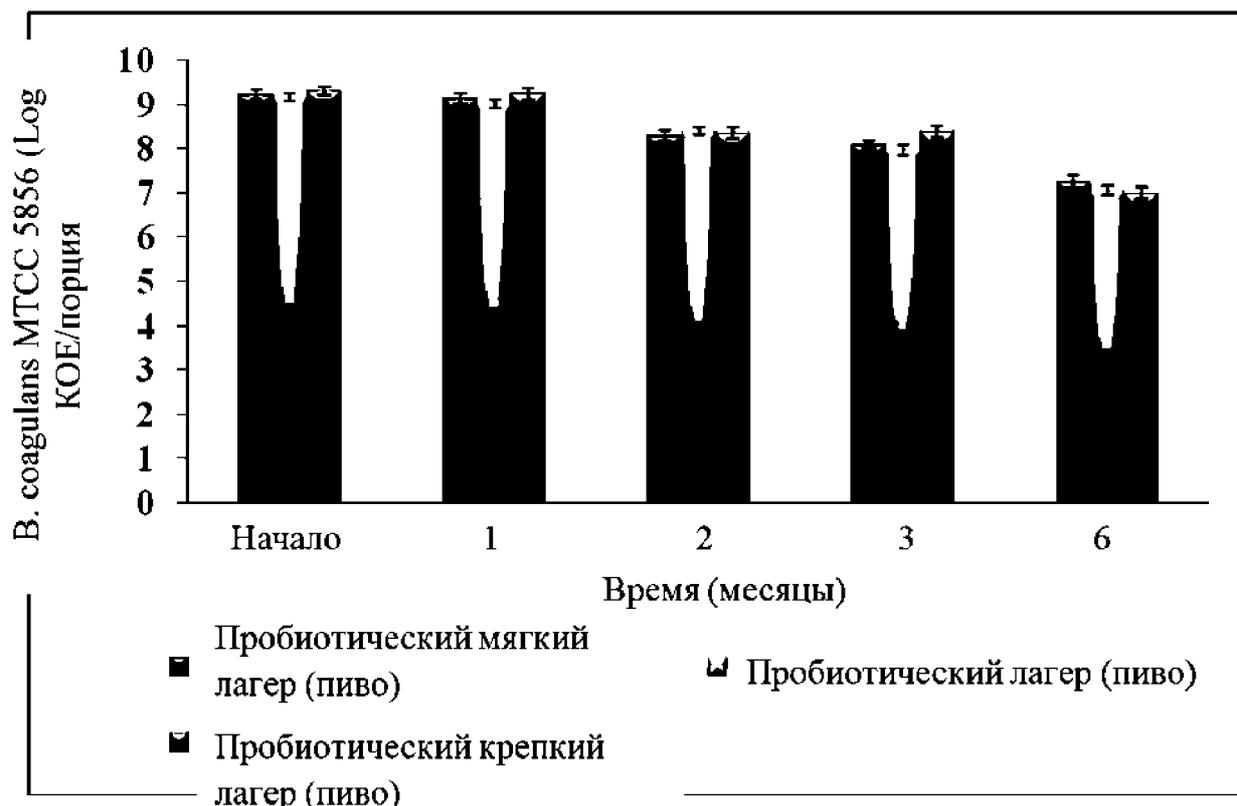
Фиг. 2b



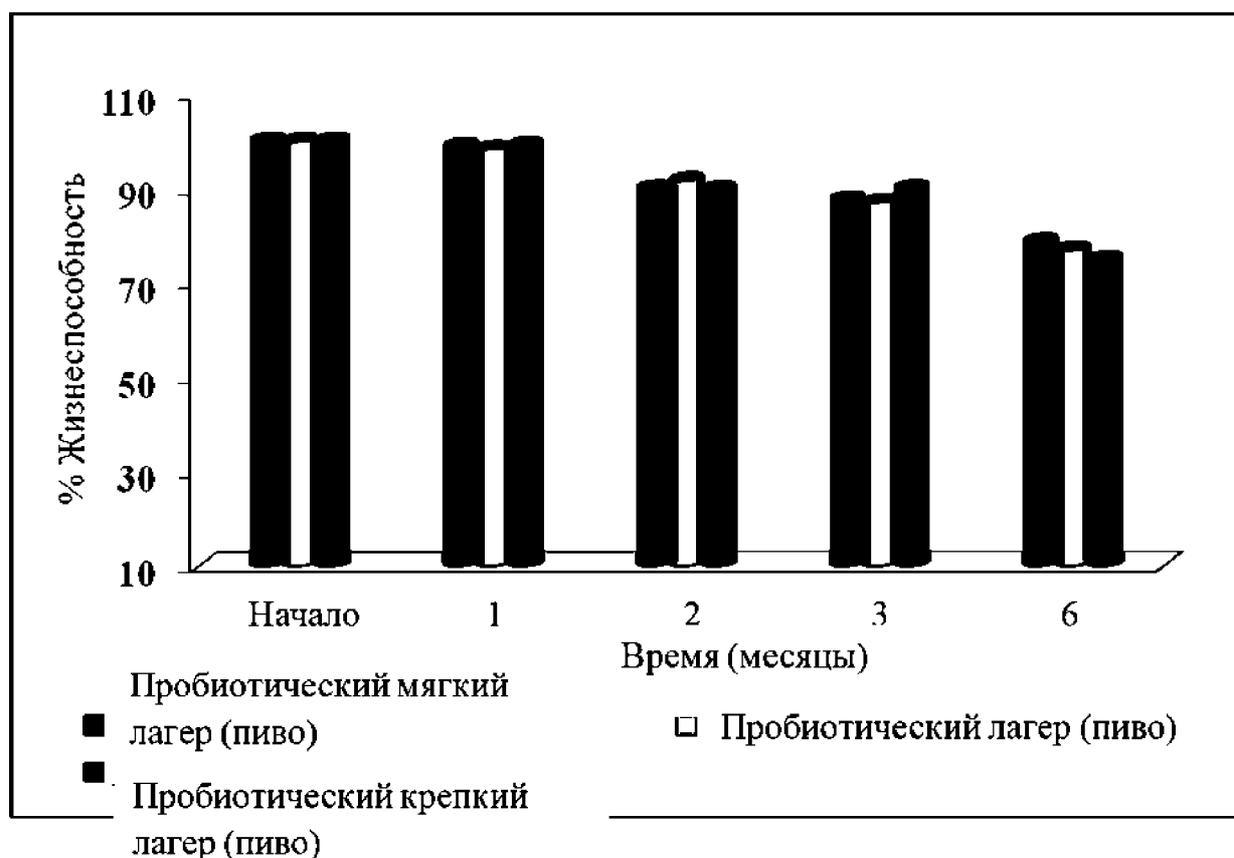
Фиг. 3а



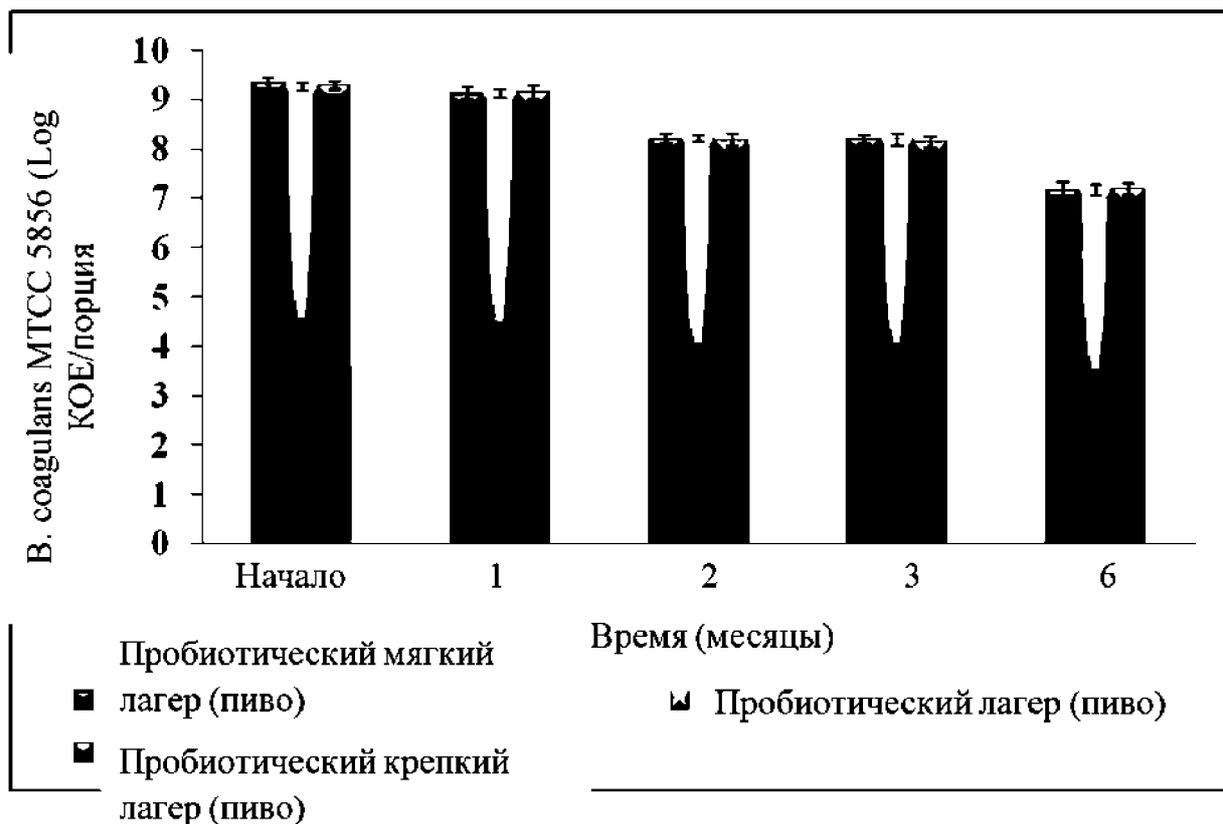
Фиг. 3б



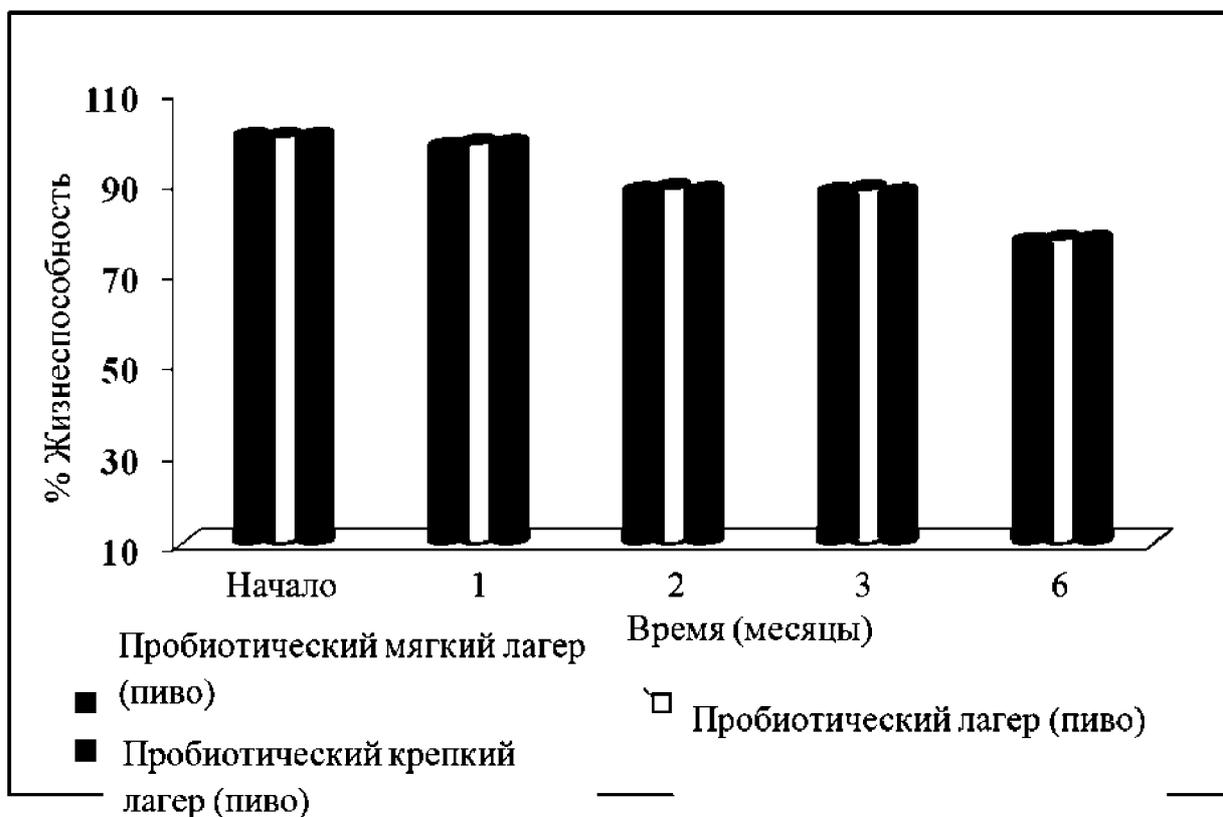
Фиг. 4а



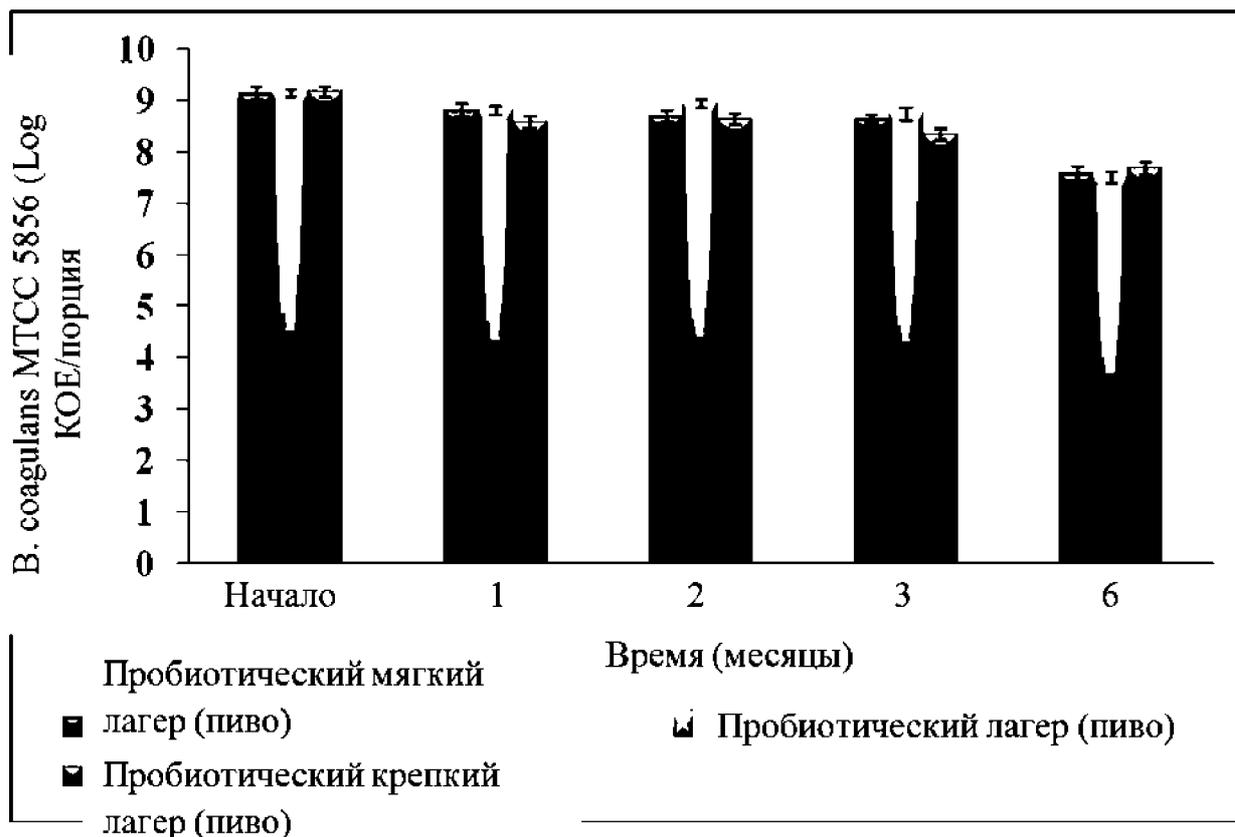
Фиг. 4б



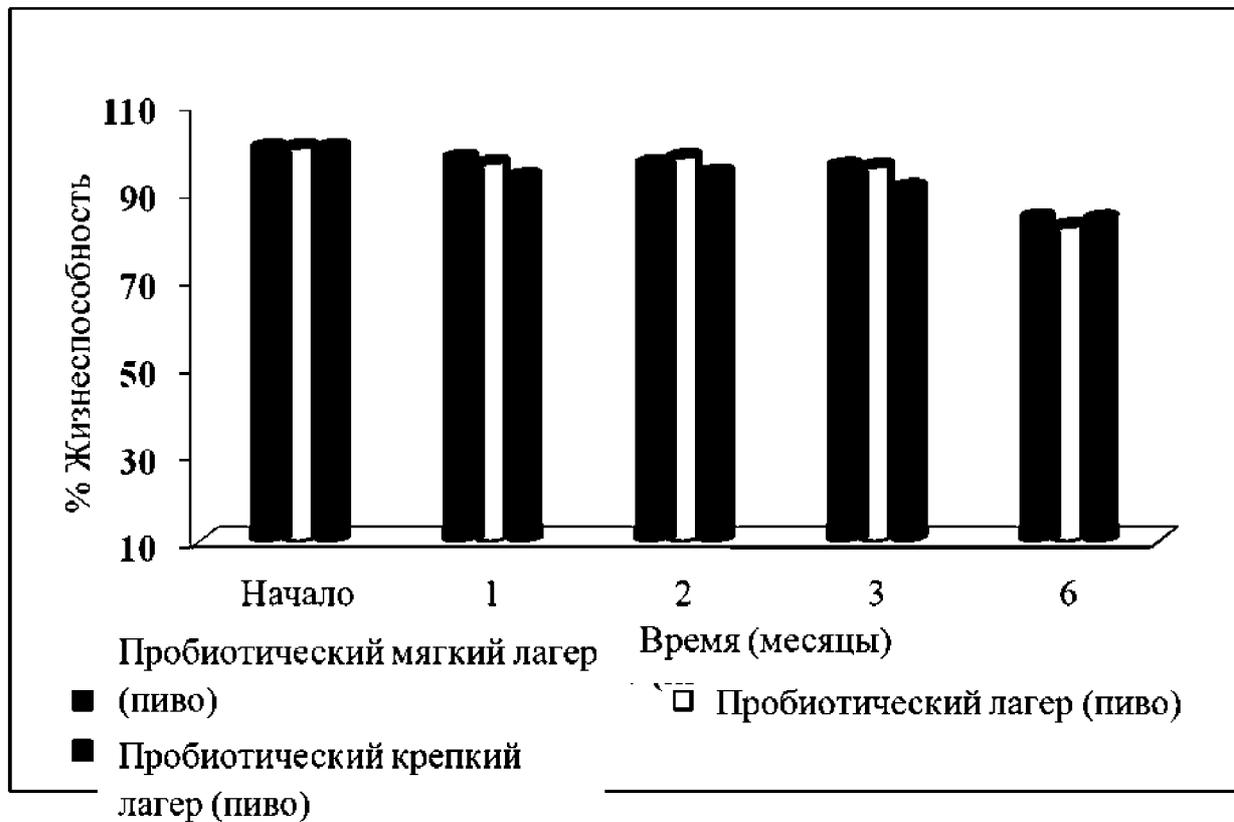
Фиг. 5a



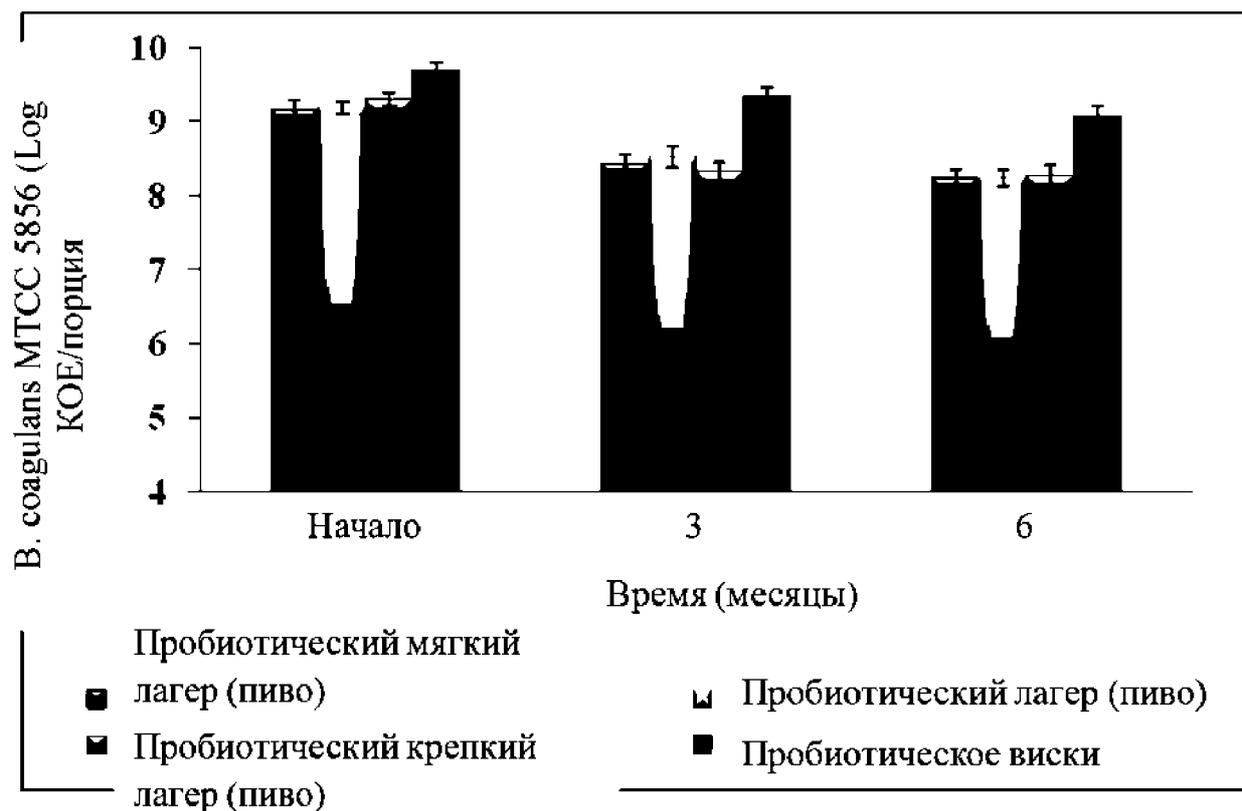
Фиг. 5b



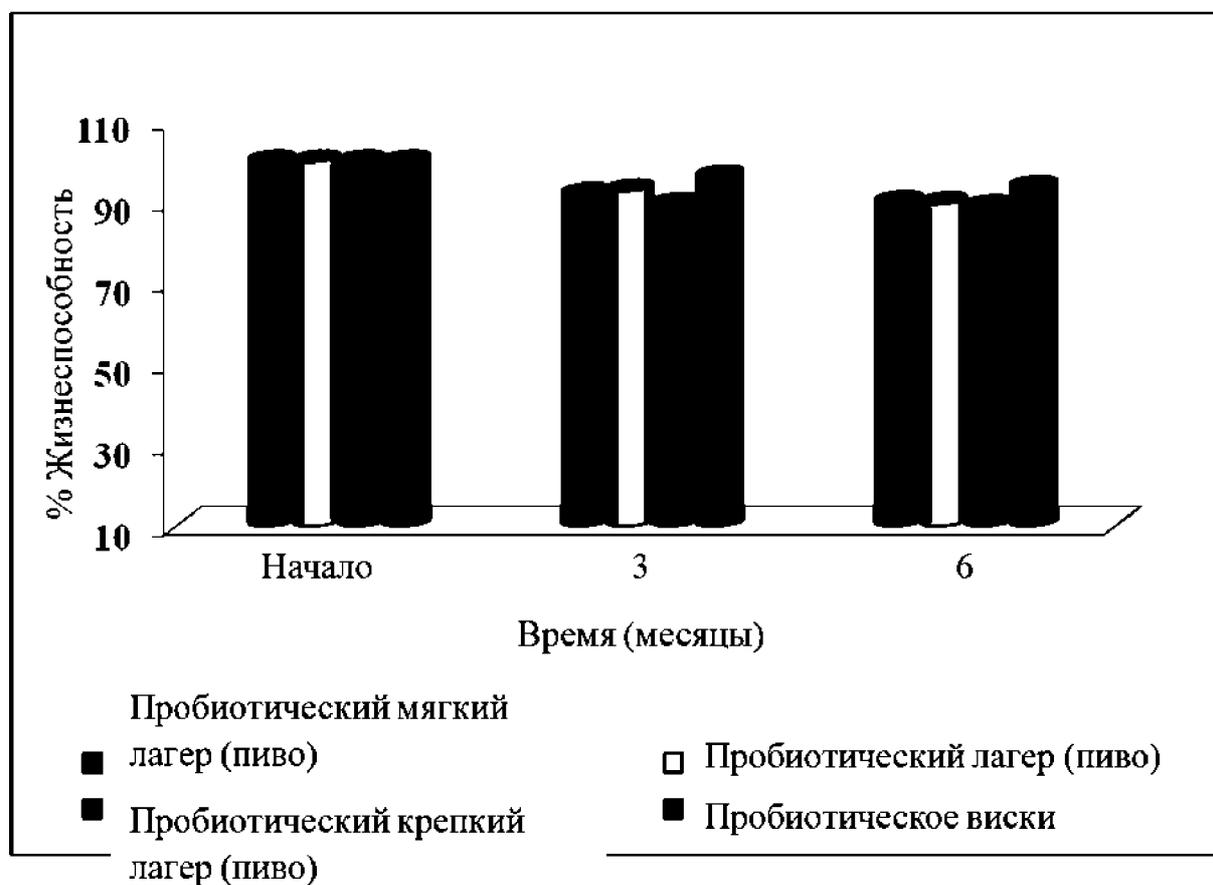
Фиг. 6a



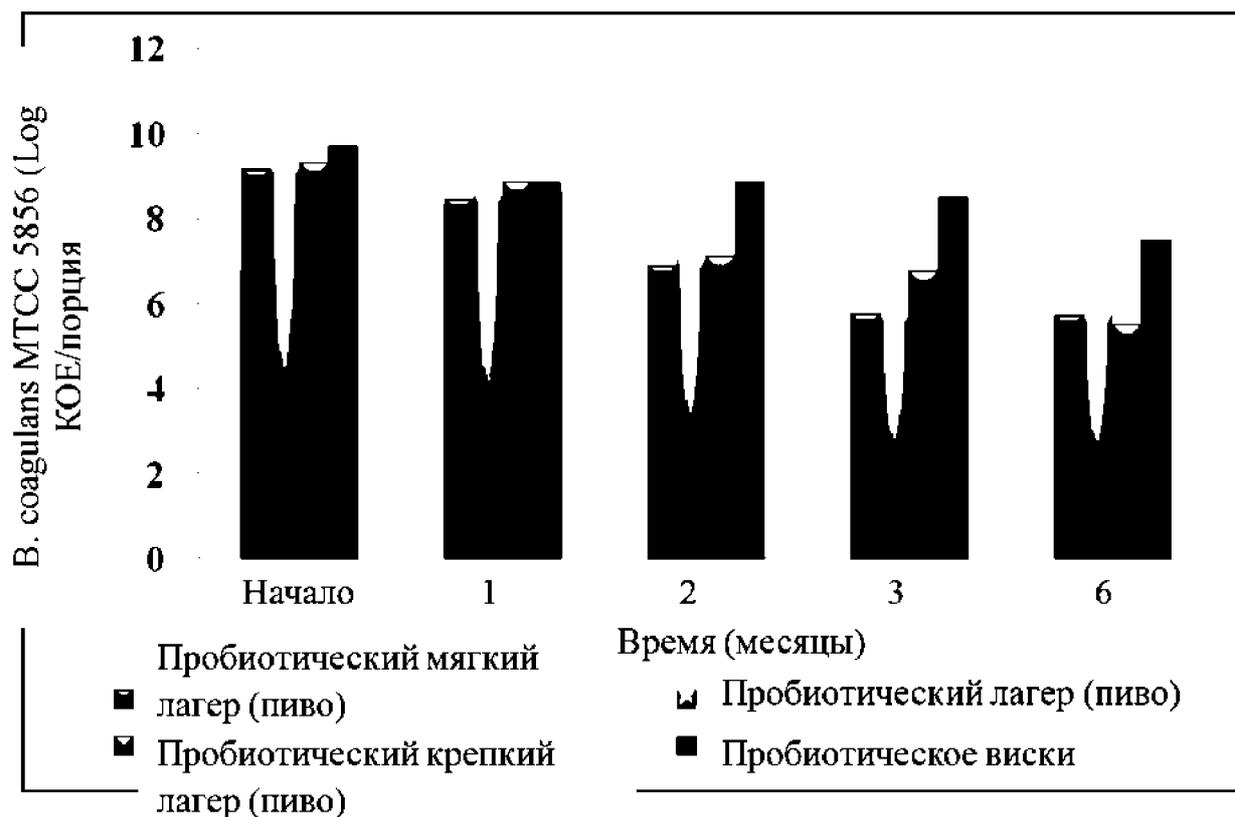
Фиг. 6b



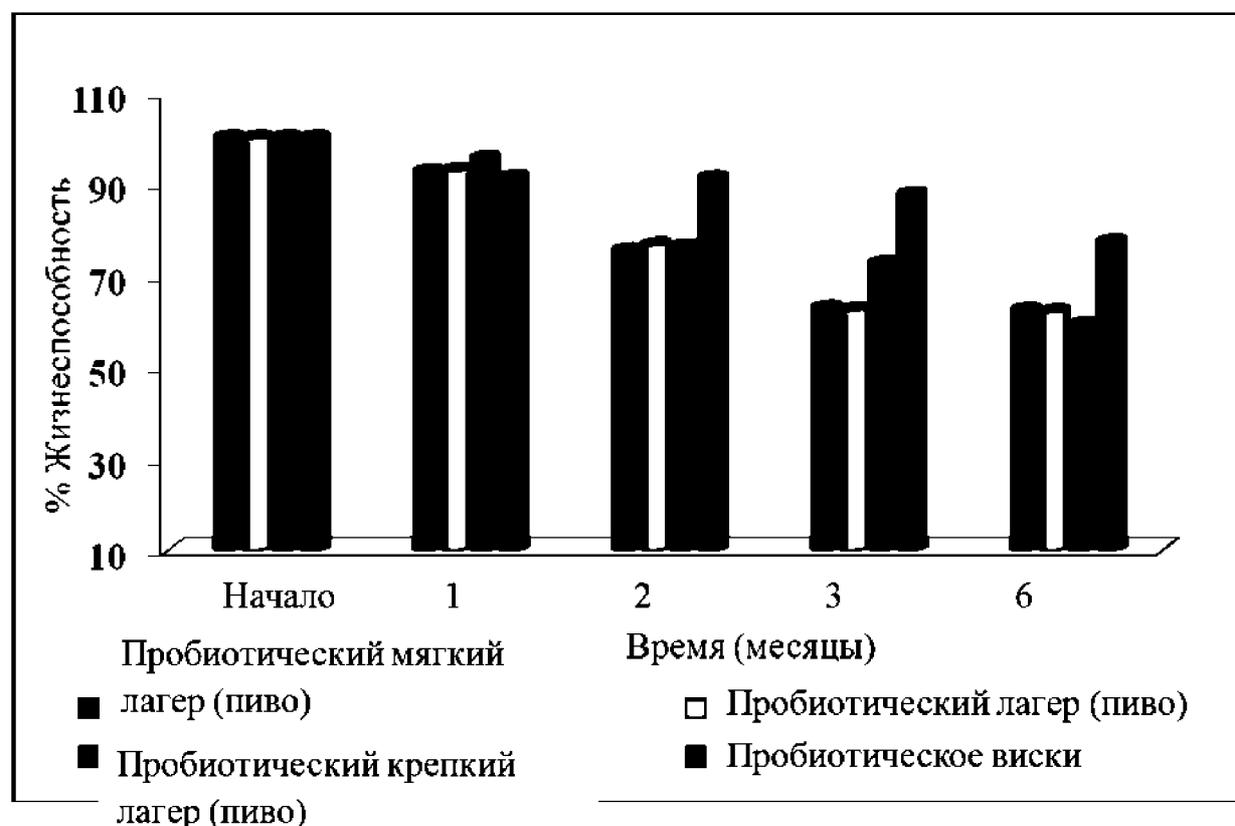
Фиг. 7а



Фиг. 7б



Фиг. 8a



Фиг. 8b